

P-8 ヒト 26S プロテアソームサブユニットのリン酸化修飾状態の解析

◎得津奏子、菅原経継、井野洋子、倉田洋一、木村弥生、東 昌市、平野 久

横浜市立大学

【目的】

タンパク質のリン酸化は、細胞内において、時間的、空間的に変化する極めて動的な現象であり、細胞の機能維持に係わる重要な調節機構として働いている。プロテアソームは、約 66 個のサブユニットから成る巨大タンパク質複合体で、ユビキチン化されたタンパク質を認識し、ATP 依存的に分解することで、多くの重要な生体機能に係わっている。これまで、多くの構成サブユニットで複数のリン酸化部位が同定されているが、機能調節との関係については十分な知見が得られていない。本研究では、Pro-Q Diamond 染色と Phos-tag 親和性電気泳動を利用して、プロテアソーム構成サブユニットのリン酸化修飾による質的変動を調べる方法を検討したので報告する。

【方法】

1) 26S プロテアソームの精製；C 末端に TEV プロテアーゼ切断部位・アビジン結合部位をもつ Rpn11（プロテアソーム構成サブユニット）を発現する形質転換 HEK293 細胞を用いた。細胞はフォスファターゼ阻害剤

カクテル含有溶液にて溶解し、細胞溶解液は Streptavidin-Sepharose と 4°C で 3 時間反応させ、プロテアソームの溶出には TEV プロテアーゼを用いた。

2) Pro-Q Diamond 染色；精製プロテアソームを SDS-PAGE（12.5%T, 2.6%C）で分離後固定し、Pro-Q Diamond 染色試薬により 90 分間染色した。脱色には 20%アセトニトリル/50 mM 酢酸ナトリウムを用いた。

3) Phos-tag 親和性電気泳動；精製プロテアソームを 25 μM Phos-tag アクリルアミドを含むゲル(10%T, 2.6%C)で分離し、検出は各サブユニット抗体を用いたウエスタンブロット分析により行った。

【結果および考察】

Pro-Q Diamond 染色により、過酸化水素刺激によりリン酸化修飾分子量が大きく変動するサブユニットを特定することができた。さらに、Phos-tag 親和性電気泳動においても、過酸化水素刺激によるリン酸化修飾分子の増加と非リン酸化修飾分子の減少を確認することができた。今後、変動修飾部位を明らかにすると共に、機能調節にもたらす影響について明らかにしていく必要がある。